DOI:10.11931/guihaia.gxzw201905004

[1]*FmJAZ1*基因瞬时侵染水曲柳对JA通路相关基因表达的影响

杨少彤[1]，刘宗林[1]，屈申[1]，于磊[1,2]，詹亚光[1,2]

（1. 东北林业大学 生命科学学院，哈尔滨 150040；2. 东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室，哈尔滨 150040）

摘要：该文将对水曲柳中JAZ蛋白家族的一员*FmJAZ1*的功能及对其上下游基因影响进行初步分析。首先利用无缝克隆的方法构建FmJAZ1-pROK2-GUS 过表达载体，利用三亲杂交的方法将载体转入农杆菌，随后使用农杆菌对水曲柳组培苗进行瞬时侵染，得到*FmJAZ1*过表达的侵染苗。最后在侵染后36 h使用DIECA（茉莉酸合成途径抑制剂）对侵染苗进行处理，分别取0、1、3、6、18、21、24 h七个时间点的样品，通过荧光定量PCR对*FmJAZ1*、*JAZ2*、*GL1*、*EIN3*、*MYC2*五个基因的表达进行分析。农杆菌瞬时侵染水曲柳幼苗后，*FmJAZ1*表达显著升高，为空载侵染的3.2倍，说明*FmJAZ1*瞬时转入水曲柳并完成基因表达，侵染有效。经过DIECA（茉莉酸合成途径抑制剂）处理的侵染苗*FmJAZ1*的相对表达量初期下降并出现明显波动，18 h后恢复平稳，证明它是JA通路的作用基因。同时检测了四个JA通路相关基因的表达，在1 h时*JAZ2*、*GL1*表达下调，其余均有轻微上调，随后各基因表达均呈上调。*FmJAZ1*瞬时转化水曲柳后*FmJAZ1*过表达，说明瞬时侵染有效；DIECA处理后*FmJAZ1*表达显著下调说明*FmJAZ1*的合成受JA调控。在水曲柳中*FmJAZ1*抑制转录因子*GL1*、*EIN3*、*MYC2*、*FmJAZ2*的表达，且*FmJAZ2*的合成也受JA调控。

关键词：水曲柳，*FmJAZ1*基因，瞬时侵染，JA通路，基因表达

中图分类号：　　　　**文献标识码：**A

Effect of transient infection of FmJAZ1 gene on JA pathway related gene expression in Fraxinus mandshurica

YANG Shaotong[1], LIU Zonglin[1], QU Shen[1], YU Lei[1,2], ZHAN Yaguang[1,2]

(1. *Northeast Forestry University*, Harbin 150040, China; 2. *State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding*, *Northeast Forestry University*, Harbin 150040, China）

Abstract: Jasmonates (JAs) are widely found in plants. In this paper, the function of *FmJAZ1*, a member of the JAZs, and the influence of its upstream and downstream genes were preliminarily analyzed. Firstly, the FmJAZ1-pROK2-GUS overexpression vector was constructed by using the method of seamless cloning, and then the vector was transferred into *Agrobacterium* by triparental hybridization. Then, *Agrobacterium* was used to conduct instantaneous infection on the tissue culture seedlings of *Fraxinus mandshurica*, and the infected seedlings with *FmJAZ1* overexpression were obtained. Finally, the infected seedlings were treated with DIECA (jasmonic acid synthetic pathway inhibitor) at 36h after infection. Samples were taken at 0, 1, 3, 6, 18, 21

基金项目：黑龙江省应用技术研究与开发计划项目（GA19B201）；大学生创新课题（201810225127）[Supported by Heilongjiang Province Applied Technology Research and Development Program (GA19B201); Undergraduate Innovation Program (201810225127)] 。

作者简介：杨少彤(1998-)，女，河北石家庄人，学士，主要研究方向为植物基因工程，(E-mail)493340323@qq.com。

***通信作者：**詹亚光，博士，教授，主要研究方向为林木遗传育种，(Email)yaguangzhan@126.com。

and 24 h, respectively. The expressions of *FmJAZ1*, *JAZ2, GL1*, *EIN3* and *MYC2* were analyzed by fluorescence quantitative PCR. After *Agrobacterium* instantaneously infected the tissue culture seedlings of *Fraxinus mandshurica*, *FmJAZ1* expression increased significantly, which was 3.2 times higher than the no-load infection. After treatment with DIECA (jasmonic acid synthetic pathway inhibitor), the relative expression level of *FmJAZ1* fluctuated significantly at the initial, but to be stable after 18h, which prove that *FmJAZ1* is acting on JA pathway. The expressions of *JAZ2* and *GL1* are down-regulated at 1h, while the others were slightly up-regulated, and later the expressions of all the genes were up-regulated. Overexpression of *FmJAZ1* after instantaneous infection of *Fraxinus mandshurica* indicated that transient infection was effective. After DIECA treatment, *FmJAZ1* expression was significantly down-regulated, indicating that the synthesis of *FmJAZ1* was regulated by JA. In *Fraxinus mandshurica*, *FmJAZ1* inhibited the expression of transcription factors *GL1, EIN3, MYC2*, and *FmJAZ2*, and the synthesis of *FmJAZ2* was also regulated by JA. JAZs not only regulates the key proteins of JA pathway, but also participates in the regulation of other signaling pathways, and finally regulates the growth and development of plants and their response to stress through the expression of JA *in vivo* and the synergistic expression of other related signaling molecules.

Key words: *Fraxinus mandshurica*, *FmJAZ1* gene, transient infection, JA pathway, gene expression

茉莉酸类物质（JAs）广泛存在于植物体中，作为信号分子，其不仅可以调节植物的生长发育，而且可以介导植物体在生物与非生物胁迫下的防御反应。JAZ（Jasmonate ZIM-domain, JAZ）蛋白（JAZs）属于 TIFY 蛋白家族，是茉莉酸通路重要调节蛋白。其参与了多个信号通路。它响应茉莉酸（JA）的刺激，释放与之结合的 MYC2 转录因子，启动 JA 应答基因的转录。有研究显示 JA 介导的 JAZ 蛋白转录水平变化与 IAA、GA、ET 等多种植物激素信号的调节相关联。由此可见，JAZ 蛋白不仅能抑制茉莉酸通路应答，还可以通过与其他调控因子互作来影响其他信号通路，进而影响植物体生长与代谢。JAZ 蛋白也由此成为了植物激素调节网络的关键枢纽（孙程等，2014；刘庆霞等，2012；Hou et al., 2013；Iván et al., 2013；Pérez & Goossens, 2013）。目前在拟南芥、水稻、青蒿等植物中关于 JAZ 蛋白家族的鉴定及其对相关重要通路的影响的研究已初有成果（王青，2017；吴华，2015；夏菁等，2018）。

水曲柳（*Fraxinus mandshuira*）是木樨科（Oleaceae）梣属（*Fraxinus*）乔木，是材质优良的珍贵用材树种，用途广泛（刘春浩等，2017；孙爽等，2017）。在人工培育水曲柳过程中发现，水曲柳易受到水曲柳翅果斑点病、水曲柳梢头白腐、小地老虎、水曲柳芫菁等多种病虫害困扰，介于 JA 通路对植物体响应胁迫具有重要意义，且其在水曲柳抵抗病虫害中发挥的作用及机制又尚未可知，该文将通过瞬时侵染的方法对水曲柳中 JAZ 蛋白家族中的一个成员（ *FmJAZ1*）的功能进行初步分析，使用 DIECA（茉莉酸合成途径抑制剂）对侵染苗进行处理并对 JA 通路相关基因（MYB 转录因子家族 GL1，MYC 转录因子家族 MYC2，乙烯通路转录因子 EIN3，JAZ 家族 *FmJAZ2*）的表达进行分析，从而探讨 *FmJAZ1* 与 JA 通路相关基因的关系，为日后对水曲柳内 JAZ 蛋白功能鉴定及其与其他通路互作的研究打下基础，从而能为水曲柳病虫害检测与防治提供更多参考。

1　材料与方法

1.1 水曲柳 FmJAZ1-pROK2-GUS 过表达载体构建

首先使用 BamHI 和 KpnI 对载体进行双酶切，同时设计一对 5′端包含 21 bp 线性化载体同源序列的引物（表 1），使用该引物对 *FmJAZ1* 进行 PCR，将目的基因与载体温浴连接，并将

连接好的载体热激转入 T1 全式金大肠杆菌感受态细胞进行培养，进行测序鉴定，得到 FmJAZ1-pROK2-GUS 过表达载体。

表 1 *FmJAZ1* 基因克隆及载体无缝克隆 PCR 引物名称及序列

Table 1 PCR primer name and sequences of FmJAZ1 gene cloning and vector seamless cloning

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
FmJAZ1-F	5' ATGGGTTCATCGGAAATTATAGATT 3'
FmJAZ1-R	5' TCAATTTGAAGTTGGGTATTGAGGA 3'
JAZ1-BKGUS-F	5' acgggggactctagaggatccATGGGTTCATCGGAAATTATAGATT 3'
JAZ1-BKGUS-R	5' catggtcaagagtccggtaccATTTGAAGTTGGGTATTGAGGAGC 3'

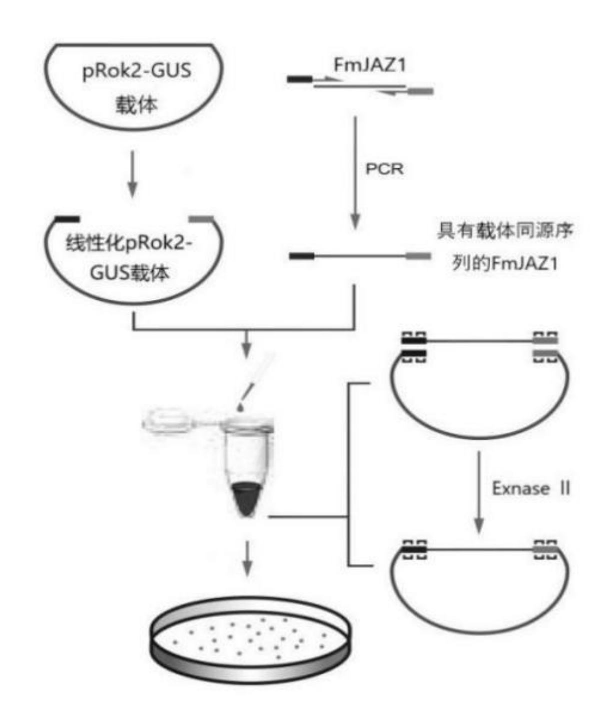


图 1 构建 FmJAZ1-pROK2-GUS 过表达载体原理图

Fig.1 Schematic diagram of costructing FmJAZ1-pROK2-GUS overexpression vector

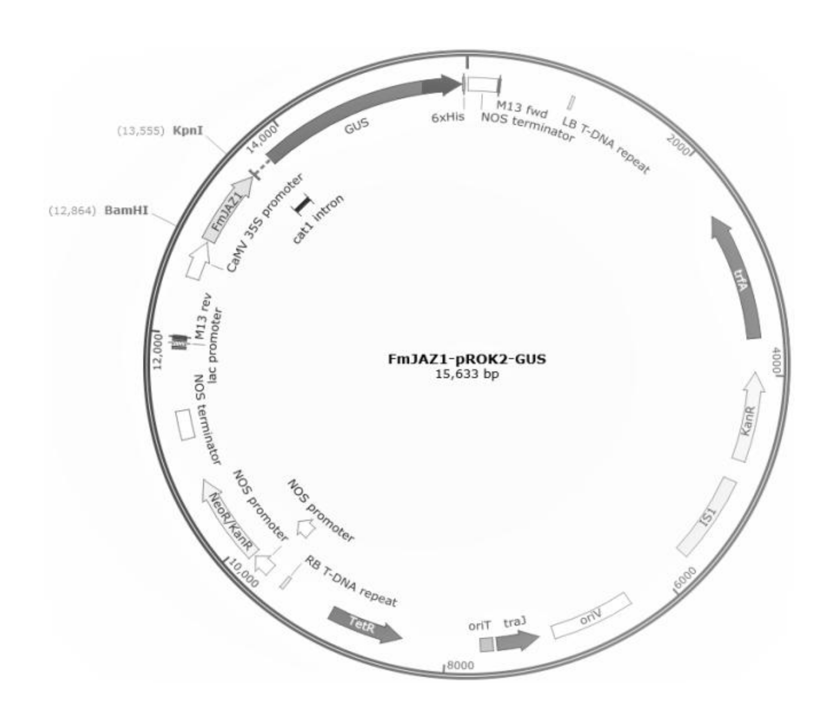


图 2 FmJAZ1-pROK2-GUS 过表达载体结构图
Fig. 2 Structure of FmJAZ1-pROK2-GUS overexpression vector

1.2 对水曲柳组培苗进行瞬时侵染

1.2.1 三亲杂交转化农杆菌

将含有 FmJAZ1-pROK2-GUS、空载的大肠杆菌菌液分别同 Helper 菌液和 LBA4404 农杆菌菌液在不含抗性的液体 LB 培养基中 28 ℃培养 24 h 进行杂交，取杂菌在含有 Rifampin 和 Kana 抗性的液体培养基 28 ℃培养 24 h 培养进行筛选，对得到的杂菌进行菌液 PCR 验证，最终得到分别含有空载和 FmJAZ1-pROK2-GUS 载体的农杆菌。

1.2.2 水曲柳 *FmJAZ1* 瞬时侵染

设计对照组和实验组，其中对照组使用含有空载的农杆菌侵染水曲柳组培苗，实验组使用含有 FmJAZ1-pROK2-GUS 载体的农杆菌侵染水曲柳组培苗，选用 OD600 值为 1.0 的农杆菌与乙酰丁香酮浓度为 120 μmol·L^{-1} 的 WPM 培养基置于摇床上共培养 2 h 进行侵染（徐威等，2003；梁童瑶，2015；Jessica et al.，2014；Li et al.，2009）。在侵染前将选好的水曲柳组培苗置于质量分数为 25%蔗糖高渗溶液中浸泡 10 min，提高组培苗韧性，减少操作过程中组培苗的损耗。将侵染结束的组培苗置于 WPM 培养基继续培养。

1.3 *FmJAZ1* 及茉莉酸通路相关调控基因的荧光定量 PCR

首先在侵染后 36 h 使用 DIECA（茉莉酸合成途径抑制剂）对完成瞬时侵染的水曲柳组培苗进行喷施处理，将两种处理过的侵染苗分别设置 0、1、3、6、18、21、24 h 七个时间点进行取样（取整株 10 cm 水曲柳组培苗为样品），每个时间点设置三组平行实验，每三株为一组，留一组不进行处理。取样时使用液氮进行冷冻并置于-80 ℃冰箱保存，待所有实验组取样完毕后，使用 Tris-cTAB 法提取样品 RNA，对 RNA 进行反转录，选取水曲柳微管蛋白基因 *FmTU* 为内参对七个时间点的 *FmJAZ1*、*FmJAZ2*、*GL1*、*EIN3*、*MYC2* 表达进行荧光定量 PCR。

表 2 qPCR 引物名称及序列
Table 2 names and sequences of qPCR primers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
qRT-Tubulin -F	5′ AGGACGCTGCCAACAACTTT 3′
qRT-Tubulin -R	5′ TTGAGGGGAAGGGTAAATAGTG 3′
qRT-FmJAZ1-F	5′ GGCGGTCAAATGATAGTTTTCG 3′
qRT-FmJAZ1-R	5′ GATGTTTGTGGCGGATTCAG 3′
qRT-FmJAZ2-F	5′ AGAGGCAGCAACAATGGAGTC 3′
qRT-FmJAZ2-R	5′ TCTTTAACGTGGTTCGGCAAT 3′
qRT-MYC2-F	5′ CATGCTTTCGTTTACTTCGGG 3′
qRT-MYC2-R	5′ CTATCCGCCTCTTTAACCACAG 3′
qRT-GL1-F	5′ TTATTCAGTGGCTCATCGTCAAG 3′
qRT-GL1-R	5′ AACTCCATAATTCGCATCTTCG 3′
qRT-EIN3-F	5′ CAGAGGCGGTTTCCATTAGAG 3′
qRT-EIN3-R	5′ CAAATCATGCGGCTTCTTGTA 3′

1.4 材料

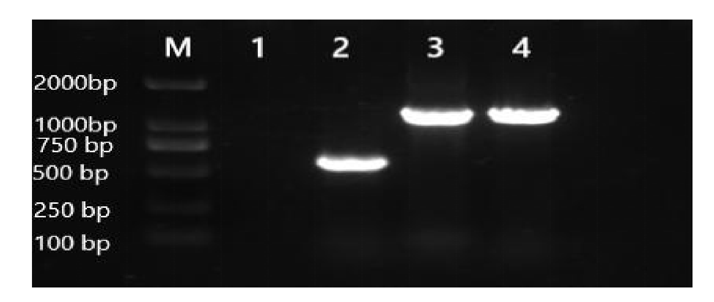
菌种：T1 全式金感受态细胞、LBA4404 农杆菌、Helper 菌。试剂盒和工具酶：南京诺唯赞 ClonExpress® Ultra One Step Cloning Kit 试剂盒、TransScript All-in-One First-Strand

cDNA Synthesis SuperMix for qPCR(One-Step gDNA Removal)试剂盒、BamHI 酶、KpnI 酶、LaTaq 酶。化学试剂及其他：卡那霉素、利福平、琼脂糖、LB 培养基、水曲柳组培苗、DIECA（茉莉酸合成途径抑制剂）、蔗糖、乙酰丁香酮、WPM 培养基、Tris-cTAB、氯仿、无水乙醇、5mol/L 氯化锂、70%乙醇、DEPC 水

2 结果与分析

2.1 三亲杂交转化农杆菌

三亲杂交后对农杆菌进行菌液 PCR 验证，对含有 pROK2-GUS 载体农杆菌 PCR 得到 500~750 bp 片段（即载体 CDS 区域），基因片段大于 500 bp,FmJAZ1-pROK2-GUS 农杆菌 PCR 得到片段在 1 000~2 000 bp，验证结果空载和 FmJAZ1-pROK2-GUS 载体均转入农杆菌。



注：**M**. DL2000 DNA Mark, **1**. 阴性对照，**2**. pROK2-GUS 载体，**3**, **4**. FmJAZ1-pROK2-GUS。

Note: **M**. DL2000 DNA Mark, **1**. Negative control, **2**. pROK2-GUS vector, **3**,**4**. FmJAZ1-pROK2-GUS.

图 3 FmJAZ1-pROK2-GUS 过表达载体转入农杆菌 PCR 验证

Fig.3 PCR verification of transferred AgrobacteriumFmJAZ1-pROK2-GUS overexpression vector

表 3 三亲杂交验证引物名称及序列

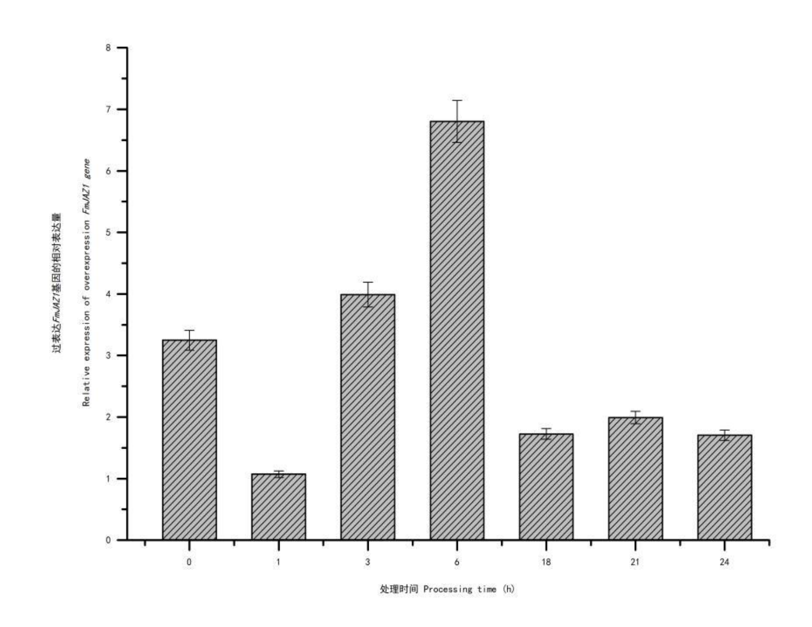
Table3 Three-parent hybridization verification’s primer names and sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
pROK2-GUS-F	5′AGGTGGCTCCTACAAATGCC 3′
pROK2-GUS-R	5′TCCACAGTTTTCGCGATCCA 3′

2.2 水曲柳瞬时侵染诱导过表达

瞬时侵染过程中组培苗不可避免的受到外界刺激，JA 含量定会有所升高，以空载侵染作为对照，通过 *FmJAZ1* 过表达来验证瞬时侵染结果。首先对七个时间点中 *FmJAZ1* 的表达量进行 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 处理计算比较 Ct 值，得到相对表达量柱状图，如图 4 所示，瞬时侵染后 36 h（尚未进行 DIECA 处理，即图中 0 h ）*FmJAZ1* 相对表达量为 3.249 01（>1），相对空载侵染表达上调，*FmJAZ1* 基因转入水曲柳组培苗，瞬时侵染有效。

由于 DIECA 处理抑制了 JA 的合成，*FmJAZ1* 的表达也受到抑制并出现波动，处理后 1h 的 *FmJAZ1* 相对表达量为 1.071 31 远低于最初的 3.249 01，这说明 *FmJAZ1* 过表达受到 DIECA 抑制，*FmJAZ1* 的合成受 JA 调控。随着时间的延长、DIECA 抑制作用减弱，JA 逐渐积累，处理 3 h 后相对表达量为 3.990 04，较 1 h 有大幅上升，处理后 6 h 的 *FmJAZ1* 表达量达到峰值 6.802 95。随后 18、21、24 h 相对表达量回落，此时 *FmJAZ1* 表达量仍是空载的 1.8、1.9 倍，表现出过表达的特征，这一方面说明瞬时侵染有效，另一方面显示 DIECA 抑制减弱后 *FmJAZ1* 表达水平出现反弹的动态变化，也验证了 *FmJAZ1* 确实是 JA 通路的关键基因。



注：图中数据为 *FmJAZ1* 侵染后的表达水平，大于 1 为上调，小于 1 为下调。下同。

Note: Data in is the expression level of FmJAZ1 after infection, greater than 1 is up-regulated, less than 1 is down-regulated. The same below.

图 4DIECA 处理后各个时间点 *FmJAZ1* 表达量

Fig.4 *FmJAZ1* expression at each time point after DIECA treatment

对各个时间点 JA 通路上下游的相关基因——*JAZ2*、*GL1*、*EIN3*、*MYC2* 的相对表达量进行分析，得到 *JAZ2*、*GL1*、*EIN3*、*MYC2* 与 *FmJAZ1* 的相对表达量数据图（图 5~8）。DIECA 处理 1h *FmJAZ1* 过表达被抑制时，*JAZ2*、*GL1* 表达下调，随后 DIECA 抑制作用减弱 *FmJAZ1* 过表达恢复并显著上调时，其余基因表达均显示上调。

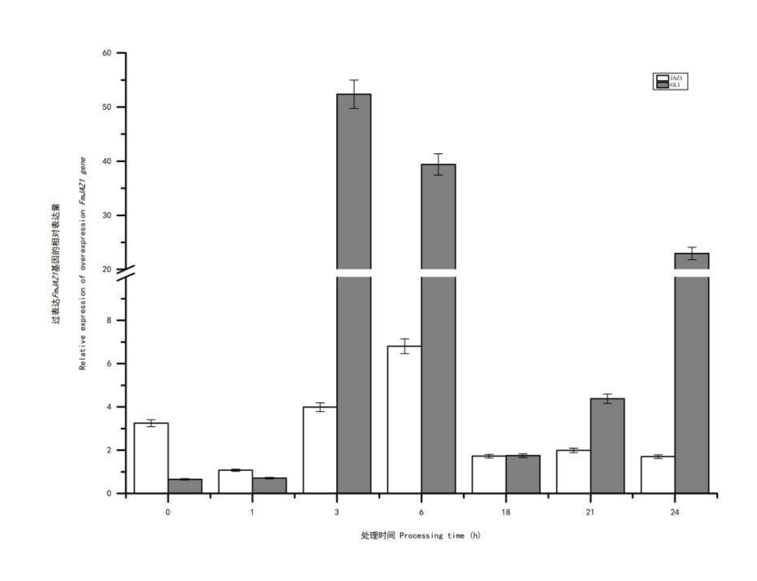


图 5 DIECA 处理后各个时间点 *GL1* 和 *FmJAZ1* 相对表达量的比较

Fig.5 Comparison of relative expression levels of *GL1* and *FmJAZ1* at each time point after DIECA treatment

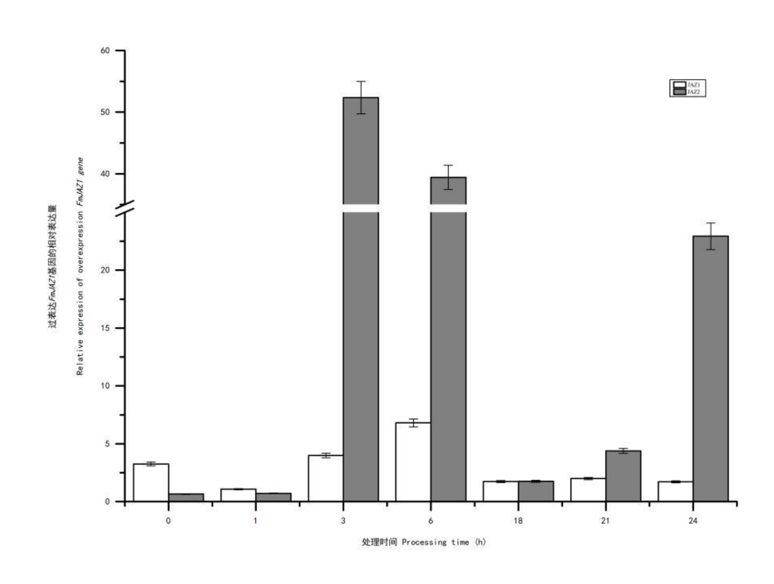


图 6 DIECA 处理后各个时间点 *JAZ2* 和 *FmJAZ1* 相对表达量的比较

Fig.6 Comparison of relative expression levels of *JAZ2* and *FmJAZ1* at each time point after DIECA treatment

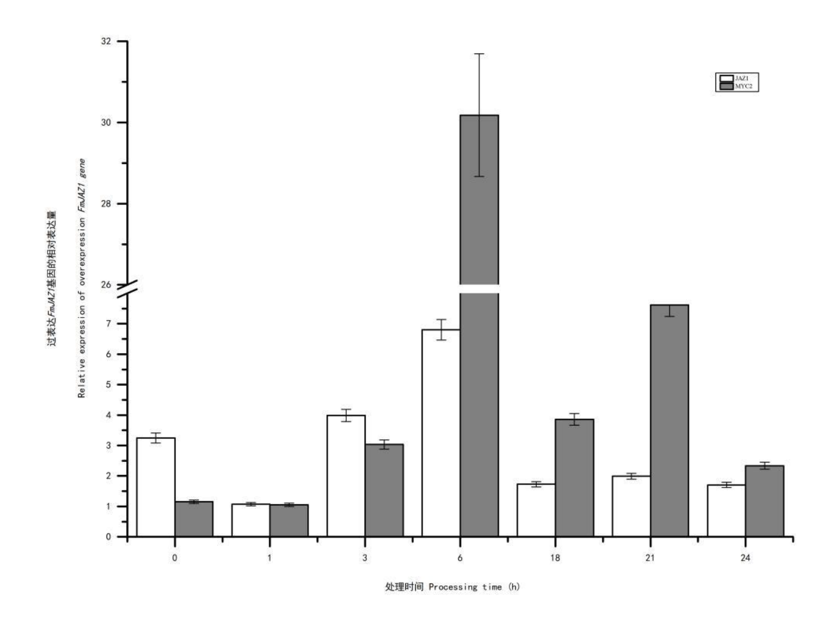


图 7 DIECA 处理后各个时间点 *MYC2* 和 *FmJAZ1* 相对表达量的比较

Fig.7 Comparison of relative expression levels of *MYC2* and *FmJAZ1* at each time point after DIECA treatment

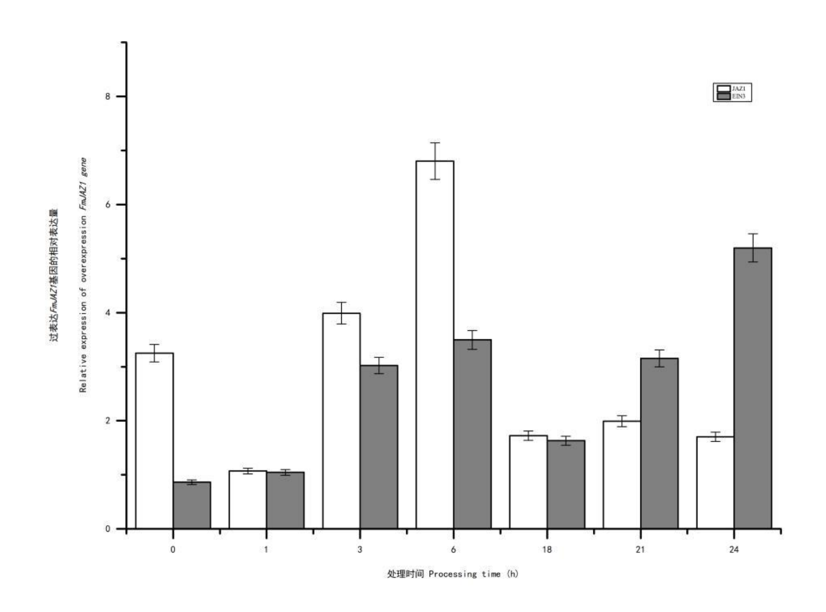


图 8 DIECA 处理后各个时间点 *EIN3* 和 *FmJAZ1* 相对表达量的比较

Fig.8 Comparison of relative expression levels of *EIN3* and *FmJAZ1* at each time point after DIECA treatment

3 讨论

JAZ 蛋白是 JA 通路的抑制因子，F-box 蛋白 COI1 可以感知生物活性 JAs，然后通过泛素-蛋白酶体途径降解 JAZs，进而激活参与植物生长、发育和防御的基因表达（图 9）。当缺乏 JA 作为激活信号时，JA 通路下游各转录因子（MYC2、GL1、EIN3）受 JAZs 蛋白抑制下游调控开关关闭；当 JA 作为激活信号存在时，COI1、JA-Ile 以及 JAZ 蛋白组成共受体复合物，COI1 通过 26S 蛋白酶调控泛素依赖的 JAZ 蛋白降解进而释放抑制状态下的转录因子， 其中 COI1 是 F-box 蛋白并且在 SCF^{COII} 泛素连接酶复合体中作为底物特异性受体存在（图 9）（李罡等，2019；吴德伟等，2018）。对侵染后 36h 的水曲柳组培苗使用 DIECA（茉莉酸合成途径抑制剂）进行处理，图 4 中处理后 *FmJAZ1* 的表达出现了一个短暂的波动，其中 1 h 的 *FmJAZ1* 表达量较未处理时上调不明显，此时 DIECA（茉莉酸合成途径抑制剂）处理抑制 JA 合成，*FmJAZ1* 的响应随之受到抑制，因此在水曲柳中 *FmJAZ1* 合成受到 JA 的调控，是 JA 通路下游转录因子。

有研究表明，JA 的合成会受到 JA 和其合成过程的中间产物的正向反馈调节，且已知 JA 合成的正向反馈回路为 SCF^{COI1}-JAZ 调控模式，可以激活 JA 合成途径中相关酶 LOX、AOC、AOS 和 OPR3 的表达；其合成也受负调节因子 JAZ 的蛋白酶体降解途径的调控，同时受 MYC2 的正调控，从而使植物体内 JA 含量及其合成相关基因的表达处于一个稳定的水平（陈碧思，2017），因此处理后 3-6 h 植物体内 JA 含量会逐渐升高， *FmJAZ1* 相对表达量有显著上调，此时的 *FmJAZ1* 一方面响应 JA 信号恢复过表达，另一方面过表达抑制 JA 下游转录因子的表达。

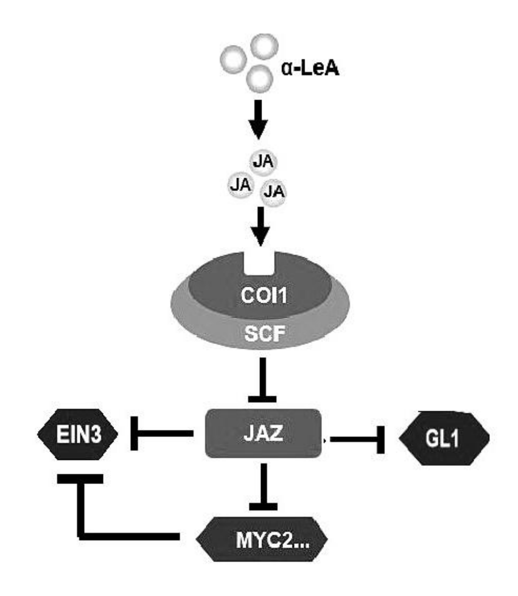


图 9 GL1、EIN3、MYC2 转录因子参与的茉莉酸信号转导通路

（改自吴德伟等，2018）

Fig.9 GL1，EIN3, and MYC2 transcription factors are involved in the JA signal transduction pathway

（Adapted from Wu et al., 2018）

MYB 转录因子通过与 JAZs 互作调节茉莉酸通路，在拟南芥中 JAZ 蛋白能够作用于 WD-repeat/b HLH/MYB 复合体的 b HLH (GL3、EGL3 和 TT8) 和 MYB (MYB75、GL1) 抑制复合体的活性，JA 通过诱导 JAZ 蛋白降解， 解除 JAZ 蛋白对 WD-repeat/b HLH/MYB 复合体的抑制作用， 从而促进色素苷的积累和表皮毛的产生， 增强植物对病虫害和紫外等非生物胁迫的抗性（图 9）（吴德伟等，2018）。未处理时 *FmJAZ1* 过表达而 *GL1* 表达下调可以证明 *FmJAZ1 对 GL1* 表达具有抑制作用（图 5）。因此 3h 时 JA 积累，诱导 *FmJAZ1* 降解，其对 *GL1* 抑制大大解除, *GL1* 过表达。但是在 1 h 时，JA 含量减少，*FmJAZ1* 表达减弱，*GL1* 没有显示出上调趋势。由于 MYB 转录因子过表达会增加 JA 的合成（陈碧思，2017），由数据可得体内 JA 含量大幅降低，*GL1* 保持下调；*GL1* 过表达，JA 合成增加，推测 JA 与 *GL1* 存在互相调控。

目前对与 JAZs 各成员具体功能研究较少，现有研究显示大部分 JAZs 蛋白质都能够与其自身或其他蛋白质存在相互作用形成同源或异源二聚体参与信号转导，并且 JAZs 之间可能存在着功能冗余现象（闫会转，2014）。图 6 中所示，未处理时 *FmJAZ1* 过表达，*FmJAZ2* 表达下调，说明 *FmJAZ1* 可以抑制 *FmJAZ2* 表达。1h *FmJAZ1* 表达受抑制，*FmJAZ2* 依然表达下调，说明 *FmJAZ2* 同 *FmJAZ1* 一样，表达受 JA 调控。在 *FmJAZ1* 表达平稳时 *FmJAZ2* 再次出现显著上调，加上处理后 *FmJAZ2* 变化趋势与其他转录因子相似，由此推测水曲柳中 *FmJAZ2* 与 *FmJAZ1* 不同，它的主要功能不在于调控 JA 通路下游基因，可能存在对植物体正常生长发育的调控。

MYC2 转录因子在 JA 与其他激素及转录因子互作调控的多种发育过程中发挥重要作用， MYC2 转录因子是 MYC/bHLH 家族中的重要成员， 是 JA 信号途径中最重要的转录因子，它可以正向或负向调节多种茉莉酸介导的响应，并且与大多数的 JAZs 都互作（孙程等，2014；闫会转，2014），其不仅是大量 JA 信号通路分支的核心调控因子， 还可以调控植物组织和器官的生长发育（李罡等，2019）。同样都是 JA 下游转录因子，*MYC2* 和 *GL1* 不同处理后并没有下调，甚至有轻微上调，一方面是由于 *MYC2* 可以诱导 JA 合成，另

一方面是植物体正常情况下存在与 JAZs 竞争性结合 MYC2 的因子，使 *MYC2* 表达从而介导 JA 信号，维持植物体生长和防御之间的平衡（闫会转，2014）。图 7 中 *MYC2* 上调程度随 *FmJAZ1* 变化而变化，可见在水曲柳中 MYC2 是 JA 通路主要调控的转录因子，主要受 JAZs 调控。FmJAZ1 虽是 MYC2 抑制蛋白，在 *FmJAZ1* 过表达时 *MYC2* 表现出上调；*FmJAZ1* 上调程度下降时，*MYC2* 也随之变化，可见二者之间存在由 JA 介导的反馈机制，即当 *FmJAZ1* 过表达时，*MYC2* 过表达促进 JA 合成，进而降解 *FmJAZ1*，但是 *JA* 合成又会诱导 *FmJAZ1* 表达，*FmJAZ1* 和 *MYC2* 由此通过 JA 互相钳制，导致其随彼此变化而变化。

乙烯是重要的植物激素，茉莉酸和乙烯具有协同和依赖作用。*EIN3* 转录因子负责促进乙烯传感下游基因转录。当 JAZs 结合 *EIN3* 时会部分的抑制它的活性；当有 JA 存在时，JAZs 被降解，使得 *EIN3* 全部激活这样乙烯转录因子 *EIN3* 通过与 JAZs 的联系使得乙烯调控分级进行（孙程等，2014）。图 8 所示，处理后 1h *FmJAZ1* 对 *EIN3* 抑制作用持续存在，随着 JA 含量恢复，*FmJAZ1* 对 *EIN3* 抑制作用随之解除 *EIN3* 过表达。但是同为转录因子为何 *EIN3* 的上调程度远不及 *MYC2* 和 *GL1*。推测原因可能是在水曲柳中也存在 *MYC2* 抑制 *EIN3* 表达的机制，*MYC2* 几十倍的上调表达影响了 JA 对 *EIN3* 的诱导。

综上所述，我们对 *FmJAZ1* 功能结合其与上下游基因关系进行了初步分析，并对相关基因与 JA 通路关系进行合理推测。在水曲柳中 *FmJAZ1* 表达与否取决于植物体内 JA 含量，数据显示，*FmJAZ1* 不仅具有对 JA 通路重要转录因子 MYC2 的抑制功能，并且对 MYB 转录因子家族成员 GL1、乙烯通路转录因子 EIN3 同样具有抑制功能，区别在于，MYC2、GL1 转录因子虽然受 *FmJAZ1* 抑制，但在一定条件下它可以调控 *FmJAZ1* 的降解。*FmJAZ2* 也受 *FmJAZ1* 的抑制且其表达也由 JA 决定，但其功能不详，应当与 *FmJAZ1* 不同。

通过对 *FmJAZ1* 以及对 JA 通路相关基因的分析，可以看出在水曲柳中，JAZs 不仅调控 JA 通路的关键蛋白，也参与调控其他其他信号通路，并最终通过体内 JA 表达及其它相关信号分子的协同表达来调节其生长发育和对胁迫的响应，水曲柳中相关信号分子的研究和互作机制的揭示将对水曲柳人工栽培，水曲柳抵抗病虫害能力的增强具有重要意义。

参考文献：

PÉREZ AC, GOOSSENS A, 2013. Jasmonate signalling: A copycat of auxin signalling?[J]. Plant, Cell Environ, 12(36): 2071-2084.

CHEN BS, 2017. Molecular mechanism of two MYB transcription factor genes in rapeseed and *Arabidopsis thaliana* regulating ros and ja signal transduction respectively [D]. Xi’an: Northwest A & F university. [陈碧思，2017. 油菜与拟南芥中两个 MYB 转录因子基因分别调控活性氧与茉莉酸信号转导的分子机制研究[D]. 西安：西北农林科技大学.]

CHEN XL, EQUI R, BAXTER H, et al., 2010. A high-throughput transient gene expression system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.) seedlings[J]. Biotechnol Biofuel, 9(3).

HOU XL, DING LH, YU H, 2013. Crosstalk between GA and JA signaling mediates plant growth and defense[J]. Plant Cell Rep, 7SI(32) : 1067-1074.

IVÁN FA，DEBORA G，AURORE C，et al.，2013. Role of NINJA in root jasmonate signaling[J]. Proc Natl Acad Sci, 28(110): 15473-15478.

JESSICA W，SHEBA G，NOREEN R，et al., 2014. Optimizing the transient Fast Agro -mediated Seedling Transformation (FAST) method in *Catharanthus roseus* seedlings[J]. Plant Cell Rep, 1(33): 89-97.

JI X, ZHENG L, LIU Y, et al., 2014. A transient transformation system for the functional characterization of genes involved in stress response[J]. Plant Mol Biol, 3(32): 732-739.

LIU QX, LI MS, GUO J, 2012. Regulation of jasmonic acid biosynthesis and its signaling pathway [J]. J Plant Physiol, 48(09):837-844.[刘庆霞，李梦莎，国静，2012. 茉莉酸生物合成的调控及其信号通路[J].植物生理学报，48(09):837-844.]

LIU CH， LIANG NS， YU L， et al., 2017. Cloning, analysing and ho-mologous expression of TCP4 transcription factor underabiotic stress and hormone signal in *Fraxinus mandschurica*[J]. J Beijing For Univ, 39 (6) :22-31. [刘春浩，梁楠松，于磊，等，2017. 水曲柳 TCP4 转录因子克隆及胁迫和激素下的表达分析[J].北京林业大学学报，39(6):22-31.]

LIANG TY, 2015. Establishment of agrobacterium-mediated transient expression system in tobacco, *Salvia miltiorrhiza* and *Prunella vulgaris* [D]. Xi'an: Northwest Agricultural and Forestry University. [梁童瑶，2015. 农杆菌介导的瞬时表达系统在烟草、丹参、夏枯草中的建立[D].西安：西北农林科技大学.]

LI JF, PARK EI, VON ARNIM A, et al., 2009. The FAST technique: A simplified *Agrobacterium* -based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of *Arabidopsis* and other plant species[J]. Plant Methods, 6(5).

LI G, LI WL, XU XM, et al., 2019. Research progress on the involvement of MYC2 transcription factors in plant development regulation [J]. J Plant Physiol, 55(2):125-132. [李罡，李文龙，许雪梅，等，2019. MYC2 转录因子参与植物发育调控的研究进展[J]. 植物生理学报，55(2):125-132.]

SUN C, ZHOU XJ,CHEN RM, et al., 2014. Function of hejaz protein [J]. Biotechnol Bull, (6):1-8.[孙程，周晓今，陈茹梅，等，2014. 植物 JAZ 蛋白的功能概述[J].生物技术通报，(6):1-8.]

SUN S, ZHAO XT, LIANG NS, et al., 2017. Expression patterns of FmABI5 gene induced by abiotic stress and signal in *Frax-inus mandshurica* [J]. Bull Bot Res, 37(3):453-460. [孙爽，赵兴堂，梁楠松，等，2017. 水曲柳 *FmABI5* 基因非生物胁迫及信号诱导的表达模式分析[J].植物研究，37(3):453-460.]

WU H, 2015. Identification and functional analysis of genes related to the resilience of the hejaz family in rice [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [吴华，2015. 水稻 JAZ 家族抗逆相关基因的鉴定和功能分析[D]. 武汉：华中农业大学.]

WANG Q, 2017. Identification and functional study of genes involved in the biosynthesis and signal transduction pathway of mulberry jasmonic acid [D]. Chongqing: Southwest University. [王青，2017. 桑树茉莉酸生物合成与信号转导途径基因的鉴定和功能研究[D].重庆：西南大学.]

WU DW, WANG JJ, XIE DX, 2018. Jasmin and plant biological stress response [J]. Biotechnol Bull, 34(7):14-23. [吴德伟，汪姣姣，谢道昕，2018. 茉莉素与植物生物胁迫反应[J]. 生物技术通报，34(7):14-23.]

XIA J, JIAN DQ, ZENG JL, et al., 2018. Cloning and functional analysis of hejaz gene [J]. Acta Pharm Sin, 53(5):812-818. [夏菁，简东琴，曾俊岚，等，2018. 青蒿 *JAZ* 基因克隆及其功能分析[J].药学学报，53(5):812-818.]

XU W, ZHU CB, ZHU BQ, et al., 2003. Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electrotransformation and three-parent hybridization [J]. J Shenyang Pharm Univ, (6):451-454. [徐威，朱春宝，朱宝泉，等，2003. 利用电转化和三亲杂交方法高效转化根癌农杆菌[J].沈阳药科大学学报，(6):451-454.]

YAN HZ, 2014. Mechanism of JAZ2 and JAZ7 in the regulation of jasmonate-mediated transcription and metabolic reprogramming [D]. Hangzhou, Zhejiang university. [闫会转，

2014. JAZ2 和 JAZ7 调控茉莉酸介导的转录与代谢重编程的机理研究[D].杭州，浙江大学.]